

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 27 janvier 2000 (27.01.00)	
Demande internationale no PCT/FR99/01165	Référence du dossier du déposant ou du mandataire MJPcb191/143
Date du dépôt international (jour/mois/année) 17 mai 1999 (17.05.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 22 mai 1998 (22.05.98)
Déposant BENBADIS, Laurent etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

13 décembre 1999 (13.12.99)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Christelle Croci

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Translation**

**PATENT COOPERATION TREATY**

**PCT**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference MJPcb191/143	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/01165	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 17 May 1999 (17.05.99)	Priority date ( <i>day/month/year</i> ) 22 May 1998 (22.05.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/56		
Applicant COMPAGNIE GERVAIS DANONE		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 13 December 1999 (13.12.99)	Date of completion of this report 04 August 2000 (04.08.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/01165

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-14, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1-10, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/1, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

See the Supplemental Sheet.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/01165

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

Pages 1-12, containing a listing of sequences 1-3, have been taken into account in establishing the present opinion.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 99/01165

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-10	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: EP-A-0 518 096 (NESTLE SA), December 16, 1992, cited in the application

D2: WO-A-90 05459 (GENECOR INC), May 31, 1990, cited in the application.

1. **Claims 1-5** are novel but not inventive in the light of documents D1 and D2. The application offers an alternative solution to the problem of avoiding the post-acidification of a milk product in storage, following the fermentation thereof. Said solution comprises using a negative beta-galactosidase mutant form of *L. Bulgaricus* and selecting the rate and degree of acidification by modulating glucose addition. The lactose operon of said mutant carries a non-sense mutation in the beta-galactosidase gene. D1 describes a similar solution, with all the technical features of the application, and leading to all the technical effects described therein. The sole difference lies in the fact that the beta-galactosidase is inactivated by a partial deletion (page 2, lines 5-6, 41-43, 48; page 3, lines 22-24; page 5, example 1; example 3-6, page 7).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

In the light of D2, it is shown that beta-galactosidase activity can be suppressed via the insertion of a point mutation (page 14, paragraph 2 and the table on page 20) in the beta-galactosidase gene (conditional mutants generally bear a point mutation).

It is therefore obvious that it is possible to suppress the beta-galactosidase activity of *L. Bulgaricus* by a point mutation rather than a partial deletion of the beta-galactosidase gene. Claims 1-5 do not therefore involve an inventive step.

2. **Claims 6-10** are novel but not inventive, as milk products similar to those described in the present claim are disclosed in D1 and a method for preparing a milk product by fermenting milk with an *L. Bulgaricus* strain in the presence of glucose is described in D1, wherein fermentation is interrupted without cooling said milk product (examples 3-6, page 6). The subject matter of Claims 6-10 can be derived in an obvious manner from the combination of documents D1 and D2.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 99/01165

## VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. If terms such as "Anaéroculta" (page 9, line 23) refer to registered trademarks, the fact that they have not been designated as such renders the description obscure (PCT Article 5 and PCT Guidelines, PCT/C-II 4.16).
2. The terms "öse" and "NUNC" are unclear and render the description obscure (PCT Article 5).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/01165

### VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. In Claim 1, an essential feature appears to be missing: a mutation in the permease gene. Therefore, Claim 1 does not meet the requirements of PCT Article 6, in combination with PCT Rule 6.3(b), whereby an independent Claim should contain all the essential technical features required to define the invention. The lactose operon of the mutant described in the application carries a substitution in the permease gene and a non-sense mutation in the beta-galactosidase gene. The applicant rightly mentions that the reversion rate of point mutations (as the non-sense mutation described in Claim 1) is very high. As a result, the selection and conservation of a strain with a point mutation is far more difficult. However, the 1-1968 strain remains stable in the presence of glucose, as Table 1 of the description shows. Moreover, it does not appear clearly from the description that the non-sense mutation is the only essential modification and that the substitution step is secondary in achieving all the technical effects of the invention.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/56, A23C 9/123, C12N 1/20, 9/38 // (C12N 1/20, C12R 1:225)</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 99/61627</b> <b>(43) Date de publication internationale: 2 décembre 1999 (02.12.99)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR99/01165 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 17 mai 1999 (17.05.99) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 98/06456 22 mai 1998 (22.05.98) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> COMPAGNIE GERVAIS DANONE [FR/FR]; 126-130, rue Jules Guesde, F-92302 Levallois Perret (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> BENBADIS, Laurent [FR/FR]; 7, avenue de Provence, F-92160 Anthony (FR). BRIGNON, Pierre [FR/FR]; 7, rue des Brasseurs, F-67200 Strasbourg (FR). GENDRE, François [FR/FR]; 49, rue du Maréchal Foch, F-67200 Strasbourg (FR). <b>(74) Mandataires:</b> ORES, Béatrice etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
<b>(54) Title:</b> MUTANT <i>LACTOBACILLUS BULGARICUS</i> STRAINS FREE FROM BETA-GALACTOSIDE ACTIVITY <b>(54) Titre:</b> SOUCHES MUTANTES DE <i>LACTOBACILLUS BULGARICUS</i> DEPOURVUES D'ACTIVITE BETA-GALACTOSIDASE <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns mutant <i>L. bulgaricus</i> strains bearing a nonsense mutation, in at least one of the sequences coding for the lactose operon, and free from <math>\beta</math>-galactosidase activity, and lactic starters comprising said strains. Said strains and starters can be used to obtain fermented milk products from glucose-added milk.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>L'invention concerne des souches mutantes de <i>L. bulgaricus</i> portant une mutation non-sens, dans au moins l'une des séquences codantes de l'opéron lactose, et dépourvues d'activité <math>\beta</math>-galactosidase, et des ferments lactiques comprenant lesdites souches. Ces souches et ferments peuvent être utilisés pour l'obtention de produits laitiers fermentés à partir de lait additionné de glucose.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

SOUCHES MUTANTES DE *LACTOBACILLUS BULGARICUS* DÉPOURVUES  
D'ACTIVITÉ BETA-GALACTOSIDASE.

Ces souches et ferments peuvent être utilisés pour l'obtention de produits laitiers fermentés à partir  
5 de lait additionné de glucose.

La présente Invention est relative à de nouveaux variants de *bulgaricus* et à leur utilisation pour la préparation de produits laitiers fermentés.

Les yoghourts sont traditionnellement obtenus  
10 par fermentation du lait avec une association de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Au cours de la fermentation qui est effectuée à une température d'environ 40 à 45°C, ces bactéries utilisent principalement le lactose comme substrat énergétique, et  
15 produisent de l'acide lactique qui entraîne la coagulation du lait ; lorsque le pH atteint une valeur d'environ 4,8 à 4,5, on met fin à cette étape de fermentation (également dénommée « acidification ») en refroidissant le produit. Celui-ci est ensuite maintenu  
20 au froid pendant la suite du processus de fabrication et de conditionnement, et jusqu'à sa consommation.

Cependant, le refroidissement ne stoppe pas complètement la fermentation lactique ; même lorsque le produit est maintenu à 4°C, on observe une augmentation  
25 progressive de son acidité au cours du temps.

Ce phénomène, connu sous le nom de post-acidification, est responsable d'une dégradation des qualités organoleptiques du produit pendant sa conservation.

30 La post-acidification résulte essentiellement de l'utilisation par les bactéries, et principalement par *L. bulgaricus*, du lactose restant dans le produit à l'issue de l'étape d'acidification contrôlée. Pour l'éviter, il a été proposé d'utiliser des souches de  
35 *L. bulgaricus* ne fermentant pas, ou très peu, le lactose.

Une des enzymes essentielles pour la fermentation du lactose est la  $\beta$ -galactosidase, qui hydrolyse le lactose en glucose et galactose. Il a donc été proposé, pour obtenir des souches non-  
5 postacidifiantes de *L. bulgaricus*, de produire des mutants artificiels, ou de sélectionner des mutants naturels, chez lesquels l'activité de cette enzyme était affectée.

Par exemple, le Brevet EP 402 450 au nom de  
10 GENENCOR décrit l'obtention, par mutagenèse localisée du gène de la  $\beta$ -galactosidase, de mutants conditionnels de *L. bulgaricus*, chez lesquels la  $\beta$ -galactosidase qui est active lors de la fermentation à 40°C, perd son activité à la température ou au pH correspondant aux conditions de  
15 conservation des produits laitiers fermentés.

La Demande JP 90053437 décrit l'obtention d'un mutant artificiel de *L. bulgaricus* ayant complètement perdu la capacité de fermenter le lactose, et la sélection d'un mutant naturel, à capacité réduite de  
20 fermentation du lactose ; ces mutants sont néanmoins capables, l'un comme l'autre, de se développer et d'acidifier normalement en présence de *S. thermophilus*, à condition que le milieu soit supplémenté en glucose. Les sous-cultures de ces mutants conservent leurs  
25 caractéristiques d'acidification, dans du lait dépourvu de glucose, après 10 repiquages.

Le Brevet EP 0518 096, au nom de la SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ, propose d'utiliser pour la fabrication de yoghourt, des mutants faiblement  
30 postacidifiants de *Lactobacillus bulgaricus* préalablement sélectionnés sur le critère de la délétion d'un fragment du gène de la  $\beta$ -galactosidase. Le criblage et la caractérisation de ces mutants sont facilités, du fait que la présence de cette délétion peut être facilement  
35 vérifiés sur des profils de restriction. En outre, les délétions sont connues pour être des mutations

irréversibles, ce qui permet d'obtenir facilement des souches mutantes stables à partir de la souche mère. Le Brevet EP 0518 096 décrit 2 types de mutants faiblement postacidifiants sélectionnés de la sorte. Les premiers  
5 ont une délétion touchant uniquement le gène de la  $\beta$ -galactosidase ; lorsqu'ils sont associés à *S. thermophilus* et cultivés sur du lait, ils présentent, même en l'absence d'ajout de glucose, des propriétés de croissance et d'acidification comparables à celles de la  
10 souche sauvage dont ils sont issus. Les seconds présentent une délétion plus importante, s'étendant sur au moins 1kb en aval du gène de la  $\beta$ -galactosidase ; lorsqu'ils sont associés à *S. thermophilus* ils croissent plus lentement et acidifient beaucoup moins que la souche  
15 sauvage dont ils sont issus ; l'ajout de glucose au milieu de culture n'a que peu d'influence sur leurs propriétés d'acidification et de post-acidification.

Les mutants naturels chez lesquels la  $\beta$ -galactosidase est inactive sont beaucoup plus difficiles  
20 à sélectionner et à maintenir en cultures pures dans le cas de mutations ponctuelles que dans le cas de mutants de délétion ; ceci s'explique par la probabilité plus faible qu'une mutation ponctuelle produise une protéine inactive, par la plus grande difficulté pour localiser et  
25 caractériser les mutations ponctuelles par des profils de restriction, et par le taux de réversion très important.

La Demanderesse a maintenant trouvé d'autres mutants naturels de *L. bulgaricus*, ne portant pas de délétion dans le gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase, et  
30 présentant des caractéristiques technologiques avantageuses. Dans le cadre de la présente invention, un mutant non-sens, incapable d'assimiler le lactose, a été isolé à partir d'une culture d'un *L. bulgaricus* sauvage. Associé à *S. thermophilus*, en culture sur du lait, il  
35 croît et acidifie beaucoup plus lentement que la souche sauvage dont il est issu. En revanche, sa croissance et

son acidification sont quasi-normales lorsque le lait est supplémenté en glucose.

La présente Invention a pour objet une souche mutante de *L. bulgaricus* dépourvue d'activité  $\beta$ -galactosidase, caractérisée en ce qu'elle porte une mutation introduisant un codon non-sens dans l'une des séquences codantes de l'opéron lactose et en particulier celle codant pour la  $\beta$ -galactosidase.

Une souche de *L. bulgaricus* conforme à l'invention a été déposée selon le Traité de Budapest le 14 janvier 1998, auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) tenue par l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, à Paris, sous le numéro I-1968.

Cette souche présente les caractéristiques morphologiques et biochimiques suivantes :

- Morphologie : Microorganisme Gram-positif, bacilles fins, pléomorphes, asporogènes, isolés ou en courtes chaînes, immobiles.
- Métabolisme : homofermentaire, catalase (-).
- Fermentation des sucres : D-glucose (+), D-fructose (+), D-mannose (+), esculine (+).

Les Inventeurs ont séquencé l'opéron lactose chez le mutant I-1968. La séquence correspondante est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1. Les séquences des produits de traduction (perméase et  $\beta$ -galactosidase) sont respectivement représentées sous les numéros SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3

L'analyse de cette séquence fait apparaître deux mutations ponctuelles : l'une, au niveau du gène de la perméase (position 122 de la séquence SEQ ID NO:1), induit un changement d'acide aminé (Lys  $\rightarrow$  Asn) ; l'autre, au niveau du gène de la  $\beta$ -galactosidase (position 4519 de la séquence SEQ ID NO:1), introduit un codon de terminaison. Bien que conservant ses sites actifs



(positions 464 et 531), la  $\beta$ -galactosidase produite par ce mutant est inactive. Les Inventeurs ont en outre constaté que cette mutation restait stable après plusieurs séries de repiquages sur un milieu de culture  
5 contenant du glucose. En revanche, sur un milieu de culture en absence de glucose, cette mutation non-sens réverte très rapidement à un taux d'environ  $10^{-6}$ .

La présente invention englobe également des souches mutantes incapables d'assimiler le lactose,  
10 dérivées de la souche I-1968. De telles souches peuvent par exemple être obtenues en induisant par mutagénèse dirigée, d'autres mutations dans l'opéron lactose de la souche I-1968.

La présente Invention a également pour objet  
15 un ferment lactique, en particulier un ferment du yoghourt, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une souche de *L. bulgaricus* conforme à l'Invention telle que définie ci-dessus, de préférence associée à au moins une souche de *S. thermophilus*.

20 Pour l'obtention d'un ferment conforme à l'invention, on peut utiliser n'importe quelle souche de *S. thermophilus* convenant pour la fabrication de yoghourt ; le choix d'une ou plusieurs souches de *S. thermophilus* peut être effectué en fonction des  
25 caractéristiques additionnelles que l'on souhaite éventuellement conférer au produit fini.

A titre d'exemple de souches de *S. thermophilus* pouvant être utilisées en association avec une souche de *L. bulgaricus* conforme à l'invention,  
30 on peut citer les souches suivantes, déposées auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) tenue par l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, à Paris :

- la souche déposée le 25 août 1994, sous le  
35 numéro I-1470, et la souche déposée le 23 août 1995, sous

le numéro I-1620 ; ces 2 souches sont décrites dans la Demande Européenne publiée sous le numéro 96/06924 ;

- les souches déposées le 30 décembre 1994, sous les numéros I-1520 et I-1521 ; ces 2 souches sont  
5 décrites dans la Demande Internationale PCT WO 96/20607 :

- la souche déposée le 24 octobre 1995 sous le numéro I-1630 ; les caractéristiques de cette souche sont décrites dans la Demande Internationale PCT WO 96/01701.

Ces souches peuvent être associées entre  
10 elles, ou avec une ou plusieurs autres souches industrielles de *S. thermophilus*.

La ou les souche(s) de *S. thermophilus* sont associées avec la ou les souche(s) de *L. bulgaricus* conformes à l'invention de la même manière et dans les  
15 mêmes proportions que dans les ferments du yoghourt traditionnels ; la population de bactéries *L. bulgaricus* conformes à l'invention peut par exemple représenter entre 10 et 90%, de préférence entre 20 et 50%, de la population bactérienne totale.

La présente Invention a également pour objet un procédé de préparation d'un produit laitier fermenté caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on fermente du lait à l'aide d'un ferment comprenant au moins une souche de *L. bulgaricus* conforme  
20 à l'Invention, en présence d'au moins un sucre assimilable par ladite souche ; il peut s'agir notamment du fructose, du mannose, et de préférence, du glucose. Avantageusement ledit produit laitier fermenté est un yoghourt.

Le procédé conforme à l'Invention est similaire aux procédés traditionnels de préparation du yoghourt en ce qui concerne les principales modalités de mise en œuvre de l'étape d'acidification contrôlée ; en particulier cette acidification est effectuée à une  
35 température comprise entre 20 et 45°C, et de préférence entre 30 et 45°C, et en « batch », c'est à dire en une

seule étape et en utilisant une seule cuve de fermentation.

La durée de cette étape d'acidification contrôlée est généralement de l'ordre de 6 à 24 heures, et de préférence de l'ordre de 6 à 16 heures ; elle est donc plus longue que dans le cas des procédés classiques de préparation de yoghourt (où elle est de 3 à 5 heures à 44°C). En effet, les souches de *L. bulgaricus* conformes à l'Invention, même associées à *S. thermophilus*, croissent et acidifient beaucoup plus lentement que les souches sauvages.

En outre, la vitesse de croissance et d'acidification des souches de *L. bulgaricus* conformes à l'invention varie très significativement en fonction de la quantité de glucose ajoutée au lait. Cette propriété permet de contrôler leur croissance et leur acidification, par simple addition de la quantité souhaitée de glucose en début de fermentation.

Les Inventeurs ont en outre observé que, lors de la mise en oeuvre de souches de *L. bulgaricus* ou de ferments conformes à l'Invention, l'acidification ralentit considérablement lorsque le pH atteint la zone de 4,8 à 4,5, (qui correspond à la zone de pH où l'on arrête l'acidification dans le cas d'un procédé traditionnel), et se stabilise, même si l'on maintient le lait à température de fermentation, à un pH plancher. La valeur de ce pH plancher dépend essentiellement de la quantité de glucose ajoutée.

Cette propriété permet de réduire, voire d'éliminer la phase de refroidissement utilisée dans les procédés traditionnels de fabrication du yoghourt pour stopper la fermentation. Elle supprime en outre la nécessité de mesurer le pH pour déterminer le moment optimal d'arrêt de la fermentation ; pour un ferment et une quantité de glucose ajoutés déterminés, il est possible, sans risque de sur-acidification, d'arrêter la

fermentation au bout d'une durée donnée, calculée en fonction du temps nécessaire pour atteindre le pH plancher. Ceci permet de mieux contrôler la régularité du pH final et la texture du produit en fin de fermentation.

5           Avantageusement, pour la mise en œuvre du procédé conforme à l'invention, et selon le degré d'acidification auquel on souhaite parvenir, la quantité de glucose ajoutée au lait préalablement à la fermentation est comprise entre 0,5 et 10 g/l, de  
10       préférence entre 0,5 et 5 g/l.

          Le produit fermenté obtenu de la sorte peut être conservé plusieurs heures à une température proche de la température de fermentation, sans baisse du pH, ce qui permet de supprimer les installations de stockage  
15       intermédiaire au froid et d'augmenter la capacité des cuves de fermentation.

          La mise en œuvre du procédé conforme à l'Invention permet de réduire la postacidification dans les produits fermentés au cours de leur conservation à  
20       plus long terme. Le degré de postacidification peut varier selon la composition du ferment et la quantité de glucose utilisée. Cependant la postacidification est toujours nettement inférieure à celle observée dans le cas des yaourts obtenus avec les ferments et les procédés  
25       traditionnels.

          Par exemple, des expérimentations effectuées par les Inventeurs ont montré que dans les mêmes conditions de conservation (28 jours de conservation à 10°C), le  $\Delta pH$  (différence entre le pH à J0 et le pH à J28) était compris entre 0,05 et 0,4 dans le cas des  
30       produits obtenus à l'aide d'un ferment conforme à l'invention, alors qu'il était toujours supérieur à 0,7 dans le cas de ferments témoins dans lesquels la souche de *L. bulgaricus* conforme à l'invention était remplacée  
35       par une souche sauvage.

Cette faible post-acidification s'accompagne d'une bonne survie des souches du ferment ; la population de *L. bulgaricus* en fin de conservation, dans le produit fermenté obtenu conformément à l'invention n'est que  
5 légèrement inférieure à celle du produit témoin.

La présente invention a également pour objet les produits laitiers fermentés susceptibles d'être obtenus en mettant en œuvre un procédé conforme à l'invention.

10 Ces produits peuvent se conserver pendant plus longtemps et à température plus élevées que les produits obtenus par les procédés traditionnels, et possèdent des caractéristiques organoleptiques qui restent stables au cours de la conservation.

15 **EXEMPLE 1 : DOSAGE BIOCHIMIQUE DE L'ACTIVITE BETA-GALACTOSIDASE D'UN MUTANT CONFORME A L'INVENTION.**

L'activité  $\beta$ -galactosidase de la souche I-1968 a été comparée à celle de la souche sauvage de *L. bulgaricus* (dénommée ci-après LbS) dont elle est  
20 issue.

On cultive les bactéries pendant une nuit sur milieu MRS agar (MERCK) à 37°C, en jarre d'anaérobiose (MERCK) en présence d'un fixateur d'oxygène (AnaérocultA, MERCK).

25 Une ose de 10 microlitres (NUNC) de bactéries est resuspendue dans 1 millilitre d'eau stérile. Les bactéries sont lysées par 2 cycles d'agitation forte, 20 secondes à 5000 rotations par minute en présence de microbilles de verre (0,5 mm de diamètre, BIOSPEC  
30 PRODUCTS), puis rajout de 0,15 ml de chloroforme. On agite l'ensemble pendant 30 minutes à 37°C, puis on complète à 2 ml avec de l'eau stérile à 4°C. L'activité bêta-galactosidase est alors mesurée : à partir de 0,2 ml de la suspension cellulaire on rajoute 1,2 ml de tampon  
35  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,067M ; pH6,8 ; 0,05 ml de L-cystéine (SIGMA) à t0 0,05 ml de O-nitrophényl-bêta-D-galactopyranoside

(SIGMA). La réaction enzymatique est arrêtée après 0, 2, 5 ou 10 min. par 1 ml de tampon  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10%, et on effectue une mesure de la DO à 400 nanomètres sur le surnageant, après centrifugation du milieu réactionnel.

5 Les activités galactosidase de la souche-mère LbS et du mutant I-1968 conforme à l'Invention mesurées en fonction du temps sont représentées sur la Figure 1.

Ces résultats montrent que la  $\beta$ -galactosidase est totalement inactive chez le mutant conforme à l'Invention.

#### EXEMPLE 2 : STABILITÉ DU MUTANT I-1968 DE *L. BULGARICUS*

La stabilité du mutant I-1968 a été testée dans des milieux contenant comme sources de carbone soit un mélange de glucose et de lactose, soit du lactose  
15 seulement.

Une culture de I-1968 obtenue sur milieu MRS contenant du glucose est mise en sous-culture sur du lait stérilisé additionné d'autolysat de levure (2g/l), et supplémenté ou non avec du glucose (20g/l). Lorsqu'un pH de 5,2  
20 (coagulation du lait) est atteint, on prélève des échantillons de chaque sous-culture, sur lesquels on analyse la capacité des bactéries à fermenter les sucres, ainsi que la présence d'activité  $\beta$ -galactosidase (test sur plaque X-gal : colonies blanches =  $\beta$ -galactosidase  
25 moins ; colonies bleues =  $\beta$ -galactosidase plus).

Les résultats sont illustrés par le Tableau I ci-dessous.

TABLEAU I

Milieu	Lait + glucose (20g/l)	Lait
Temps pour atteindre pH 5.2	6h00	20h00
Fermentation des sucres	glucose, fructose, mannose	lactose, glucose, fructose, mannose
Test sur plaque X- gal	100% Colonies blanches	20% colonies blanches 80% colonies bleues

Ces résultats montrent qu'en présence de glucose, la souche I-1968 ne réverte pas vers une souche capable d'utiliser le lactose. En revanche dans un milieu contenant du lactose comme seule source de carbone, on observe une réversion rapide de la souche I-1968 vers l'état original.

**EXEMPLE 3 : PROPRIÉTÉS D'ACIDIFICATION, DE POSTACIDIFICATION ET DE SURVIE DU VARIANT I-1968 DE *L. BULGARICUS* EN SYMBIOSE AVEC *S. THERMOPHILUS* : CAS D'UN PROCÉDÉ DE FABRICATION D'UN YOGHOURT FERME (FERMENTATION EN ÉTUVE VENTILÉE)**

On prépare des ferments de yoghourt associant la souche I-1968 conforme à l'Invention avec différentes souches industrielles de *S. thermophilus* (les souches de *S. thermophilus* utilisées sont dénommées ci-après ST1, ST2 et ST3).

A titre de comparaison, on prépare des ferments associant la souche-mère LbS, et les mêmes souches de *S. thermophilus*.

Pour la préparation des ferments, les souches sont ensemencées séparément à 1% sur la composition suivante :

Composition pour 1 litre :

135 g de poudre de lait écrémé  
2 g d'autolysat de levure

920 ml d'eau distillée

20 g de glucose (pour la souche I-1968 uniquement)

Hydratation: 10 min

Pasteurisation: 30 min à 95°C

- 5 Le lait est ensuite refroidi à 44°C et inoculé, puis incubé à 44°C jusqu'à obtention d'une acidité de 85°D (degrés Dornic) pour les streptocoques et de 80°D pour les lactobacilles.

- 10 Les cultures sont ensuite réunies pour obtenir un ferment constitué à 80% de *Streptococcus thermophilus* et à 20% de *Lactobacillus bulgaricus*.

Les ferments ainsi obtenus sont utilisés pour inoculer la préparation suivante :

Composition pour 1 litre :

- 15 99% de lait

0, 1, ou 2 g/l de glucose

Hydratation: 10 min

Pasteurisation: 10 min à 95°C

- 20 Le lait est ensuite refroidi à 44°C et inoculé à 1%.

Pour chaque expérimentation, la composition du ferment et la quantité de glucose ajoutée sont indiquées dans le Tableau II ci-dessous :



TABLEAU II

Exp' rience	Glucose g/l	Souches	Pourcentage
1	0	ST 3	64 %
		ST 2	16 %
		LbS	20 %
2	0	ST 3	64 %
		ST 2	16 %
		I-1968	20 %
3	1	ST 3	64 %
		ST 2	16 %
		I-1968	20 %
4	0	ST 1	80 %
		LbS	20 %
5	0	ST 1	80 %
		I-1968	20 %
6	2	ST 1	80 %
		I-1968	20 %

Après inoculation, le lait est réparti en ballons et incubé à une température de 44°C. Le profil d'acidification est suivi pendant l'incubation. Les produits sont décaillés à pH 4,6 par refroidissement en cellule froide (16 heures à 4°C).

Les produits sont ensuite soumis à un test de conservation à 10°C. Dans ce test, on mesure le pH et l'acidité Dornic après 1, 14, 21 et 28 jours de conservation.

Les résultats d'acidification (temps pour atteindre un pH de 4,6 et valeur du pH à 24h) sont présentés dans le tableau III ci-dessous :

TABLEAU III

Expérience	Temps pour atteindre pH 4,6 (min)	Temps pour atteindre pH 4,5 (min)	pH à 24h
1	215	236	3,67
2	550	778	4,33
3	416	507	4,26
4	225	241	3,67
5	660	>1500	4,54
6	390	465	4,35

Les résultats du test de conservation à 10°C (suivi du pH et de l'acidité Dornic), et de la survie

(populations de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*) à 28 jours sont présentés dans le tableau IV ci-dessous :

TABLEAU IV

Expérience	Temps de stockage (jours)	pH	Acidité Dornic	<i>Streptococcus thermophilus</i> cellules/ml	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> cellules/ml
1	1	4,41	101	7,25E+08	3,35E+08
1	14	3,98	140	ND	ND
1	21	3,95	145	ND	ND
1	28	3,9	148	7,35E+08	3,30E+08
2	1	4,5	93	5,60E+08	2,90E+07
2	14	4,23	110	ND	ND
2	21	4,18	112	ND	ND
2	28	4,19	114	5,65E+08	1,87E+07
3	1	4,49	96	6,90E+08	7,45E+07
3	14	4,14	115	ND	ND
3	21	4,15	117	ND	ND
3	28	4,15	120	8,65E+08	6,30E+07
4	1	4,39	105	6,30E+07	4,40E+08
4	14	3,91	145	ND	ND
4	21	3,9	151	ND	ND
4	28	3,85	157	4,70E+08	6,40E+08
5	1	4,6	85	9,05E+08	6,70E+07
5	14	4,58	80	ND	ND
5	21	4,53	80	ND	ND
5	28	4,61	79	9,40E+08	7,00E+07
6	1	4,51	89	1,05E+09	1,96E+08
6	14	4,38	90	ND	ND
6	21	4,39	96	ND	ND
6	28	4,42	90	1,62E+09	1,91E+08

ND : Non Déterminé

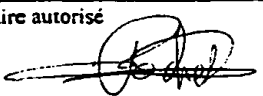
5 Ces résultats montrent que les yoghourts réalisés avec les symbioses associant la souche I-1968 à une ou deux souches de *S. thermophilus* présentent une postacidification extrêmement réduite par rapport aux mêmes symbioses avec la souche-mère LbS, tout en conservant une population abondante en fin de fermentation et une bonne survie pendant 28 jours à 10°C.

10 L'arrêt de l'acidification et le maintien du pH aux alentours de 4,6 à 4,5 pendant au moins 24 heures à 44°C permet dans le cadre de la fabrication de yoghourt brassé, de réduire, voire d'éliminer la phase de refroidissement en cuve qui est  
15 habituellement mise en œuvre.

**INDICATIONS RELATIVES À UN MICRO-ORGANISME OU  
AUTRE MATÉRIEL BIOLOGIQUE DÉPOSÉ**

(règle 13bis du PCT)

<b>A.</b> Les indications ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description page <u>4</u> , ligne <u>9-22</u>	
<b>B. IDENTIFICATION DU DÉPÔT</b> <span style="float: right;">D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input type="checkbox"/></span>	
Nom de l'institution de dépôt <p align="center">Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes</p>	
Adresse de l'institution de dépôt ( <i>y compris le code postal et le pays</i> ) <p align="center">28 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, FRANCE</p>	
Date du dépôt <p align="center">14 janvier 1998</p>	n° d'ordre <p align="center">I-1968</p>
<b>C. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES</b> ( <i>le cas échéant</i> ) <span style="float: right;">Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/></span>	
<p>"En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du micro-organisme déposé ne sera accessible, jusqu'à la publication de la mention de délivrance du brevet européen ou jusqu'à la date à laquelle la demande sera rejetée, retirée ou réputée retirée, que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant (règle 28.4 de la CBE)".</p>	
<b>D. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES</b> ( <i>si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés</i> )	
<p align="center">TOUS LES PAYS PARTIES AU PCT</p>	
<b>E. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT</b> ( <i>le cas échéant</i> )	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international ( <i>spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt"</i> )	

Réservé à l'office récepteur	
<input checked="" type="checkbox"/> Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale	
Fonctionnaire autorisé 	

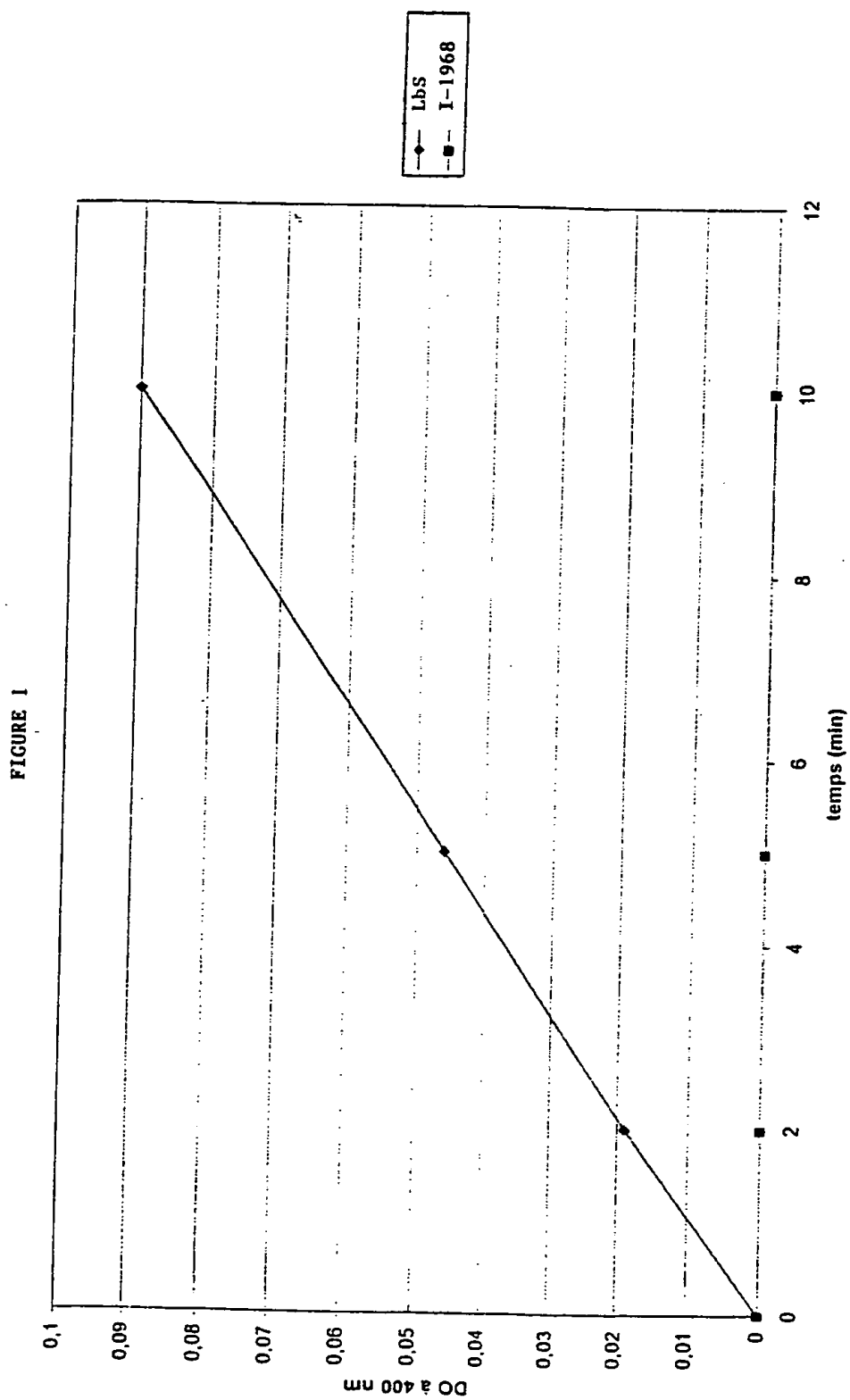
Réservé au Bureau international	
<input type="checkbox"/> Cette feuille est parvenue au Bureau international le :	
Fonctionnaire autorisé	

## REVENDEICATIONS

- 1) Souche mutante de *L. bulgaricus* dépourvue d'activité  $\beta$ -galactosidase, caractérisée en ce qu'elle porte une mutation non-sens, dans au moins l'une des séquences codantes de l'opéron lactose
- 2) Souche mutante de *L. bulgaricus* selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite séquence codante est la séquence codant pour la  $\beta$ -galactosidase.
- 3) Souche mutante de *L. bulgaricus* selon une quelconque des revendications 1 ou 2, déposée le 14 janvier 1998, auprès de la CNCM sous le numéro I-1968.
- 4) Ferment lactique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une souche de *L. bulgaricus* selon une quelconque des revendications 1 à 3.
- 5) Ferment lactique selon la revendication 4 caractérisé en ce que ladite souche de *L. bulgaricus* est associée à au moins une souche de *S. thermophilus*.
- 6) Procédé de préparation d'un produit laitier fermenté, caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on fermente du lait à l'aide d'un ferment lactique comprenant au moins une souche de *L. bulgaricus* selon une quelconque des revendications 1 à 3, en présence d'au moins un sucre assimilable par ladite souche
- 7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit sucre assimilable est le glucose.
- 8) Procédé selon une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que l'arrêt de la fermentation s'effectue sans refroidissement dudit produit laitier.
- 9) Produit laitier fermenté susceptible d'être obtenu par un procédé selon une quelconque des revendications 6 à 8.

10) Produit laitier fermenté selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit produit est un yoghourt.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**THIS PAGE BLANK (uspro)**



## LISTE DE SEQUENCES

<110> COMPAGNIE GERVAIS DANONE  
 BENBADIS, Laurent  
 BRIGNON, Pierre  
 GENDRE, François

<120> SOUCHES MUTANTES DE LACTOBACILLUS BULGARICUS DEPOURVUES  
 D'ACTIVITE BETA-GALACTOSIDASE

<130> MJPCbl91/143

<140>

<141>

<150> FR9806456

<151> 1998-05-22

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5059

<212> ADN

<213> Lactobacillus bulgaricus

<220>

<221> CDS

<222> (122)..(1873)

<220>

<221> CDS

<222> (1877)..(4519)

<400> 1

gcttggtctca cgcttgctgt acgcggccgg tgcctttggc aacgacgtct tctacgcgac 60

tctgtcaacc tactttatcg tcttcgtcac caccacctc tttaatgccg gtgaccacaa 120

g atg atc ttt atc atc acc aac ttg atc acc gcc atc cgg atc ggg gaa 169

Met Ile Phe Ile Ile Thr Asn Leu Ile Thr Ala Ile Arg Ile Gly Glu  
 1 5 10 15

gtc ctg ctc gac ccc ttg atc ggt aac gcc atc gac cgg acc gaa agc 217

Val Leu Leu Asp Pro Leu Ile Gly Asn Ala Ile Asp Arg Thr Glu Ser  
 20 25 30

cgg tgg ggg aag ttc aag ccc tgg gtt gtg ggc ggg ggg atc atc agc 265

Arg Trp Gly Lys Phe Lys Pro Trp Val Val Gly Gly Gly Ile Ile Ser  
 35 40 45

tca tta gcc ctc tta gcc ctc ttt acc gac ttt ggc ggc att aac caa 313

Ser Leu Ala Leu Leu Ala Leu Phe Thr Asp Phe Gly Gly Ile Asn Gln  
 50 55 60

agc aac ccc gtt gtt tac tta gta atc ttc ggt att gtt tac ttg att 361

Ser Asn Pro Val Val Tyr Leu Val Ile Phe Gly Ile Val Tyr Leu Ile  
 65 70 75 80

atg gat atc ttc tac tca ttt aaa gac act ggc ttc tgg gcc atg atc 409

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Met	Asp	Ile	Phe	Tyr	Ser	Phe	Lys	Asp	Thr	Gly	Phe	Trp	Ala	Met	Ile		
				85					90					95			
ccg	gcc	ttg	tcc	ctg	gat	tcc	cgg	gaa	aga	gag	aag	acc	tcc	acc	ttc	457	
Pro	Ala	Leu	Ser	Leu	Asp	Ser	Arg	Glu	Arg	Glu	Lys	Thr	Ser	Thr	Phe		
			100					105					110				
gcc	aga	gtc	ggc	tcc	acc	atc	ggg	gcc	aac	ctg	gtc	ggg	gta	gtc	atc	505	
Ala	Arg	Val	Gly	Ser	Thr	Ile	Gly	Ala	Asn	Leu	Val	Gly	Val	Val	Ile		
		115					120					125					
acc	cca	atc	atc	ctc	ttc	ttc	tcg	gcc	agc	aag	gcc	aac	ccc	aac	ggg	553	
Thr	Pro	Ile	Ile	Leu	Phe	Phe	Ser	Ala	Ser	Lys	Ala	Asn	Pro	Asn	Gly		
	130					135					140						
gat	aag	cag	ggc	tgg	ttc	ttc	ttt	gcc	ttg	atc	gtg	gcc	att	gtc	ggc	601	
Asp	Lys	Gln	Gly	Trp	Phe	Phe	Phe	Ala	Leu	Ile	Val	Ala	Ile	Val	Gly		
145					150					155				160			
atc	ttg	acc	tca	att	acc	gtt	ggt	ctt	ggt	act	cac	gaa	gta	aaa	tcc	649	
Ile	Leu	Thr	Ser	Ile	Thr	Val	Gly	Leu	Gly	Thr	His	Glu	Val	Lys	Ser		
				165				170						175			
gcc	ctg	cgg	gaa	agc	aat	gaa	aag	acc	act	ttg	aag	cag	gtc	ttt	aag	697	
Ala	Leu	Arg	Glu	Ser	Asn	Glu	Lys	Thr	Thr	Leu	Lys	Gln	Val	Phe	Lys		
			180					185					190				
gtc	ctg	ggg	caa	aac	gac	cag	ctc	ctc	tgg	ctg	gcc	ttt	gcc	tac	tgg	745	
Val	Leu	Gly	Gln	Asn	Asp	Gln	Leu	Leu	Trp	Leu	Ala	Phe	Ala	Tyr	Trp		
		195				200						205					
ttt	tac	ggc	ctg	ggt	atc	aac	acc	ctg	aac	gct	ctg	caa	ctt	tac	tac	793	
Phe	Tyr	Gly	Leu	Gly	Ile	Asn	Thr	Leu	Asn	Ala	Leu	Gln	Leu	Tyr	Tyr		
	210					215					220						
ttc	tca	tac	atc	tta	ggc	gat	gcc	cgc	ggc	tac	agc	ctg	ctt	tac	acc	841	
Phe	Ser	Tyr	Ile	Leu	Gly	Asp	Ala	Arg	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Tyr	Thr		
225					230				235					240			
atc	aac	acc	ttt	gtc	ggt	tta	atc	tct	gca	tcc	ttc	ttc	cca	tca	ctg	889	
Ile	Asn	Thr	Phe	Val	Gly	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser	Phe	Phe	Pro	Ser	Leu		
				245					250					255			
gcc	aag	aag	ttc	aac	aga	aat	cgc	ctc	ttc	tac	gcc	tgc	atc	gcg	gtg	937	
Ala	Lys	Lys	Phe	Asn	Arg	Asn	Arg	Leu	Phe	Tyr	Ala	Cys	Ile	Ala	Val		
			260					265					270				
atg	ctg	tta	ggg	atc	ggg	gtc	ttc	tcc	gtg	gcc	agc	ggt	tct	ctg	gcc	985	
Met	Leu	Leu	Gly	Ile	Gly	Val	Phe	Ser	Val	Ala	Ser	Gly	Ser	Leu	Ala		
		275				280						285					
ctg	tcc	ctt	gtt	ggg	gca	gaa	ttc	ttc	ttt	att	ccg	cag	cct	ctg	gcc	1033	
Leu	Ser	Leu	Val	Gly	Ala	Glu	Phe	Phe	Phe	Ile	Pro	Gln	Pro	Leu	Ala		
		290				295					300						
ttc	ctg	gtc	gtt	ttg	atg	atc	atc	tct	gac	gct	gtt	gaa	tac	ggc	cag	1081	
Phe	Leu	Val	Val	Leu	Met	Ile	Ile	Ser	Asp	Ala	Val	Glu	Tyr	Gly	Gln		
305					310				315					320			
ctg	aaa	act	ggc	cac	aga	gac	gaa	gct	ttg	acc	ctg	tct	gtc	cgg	cca	1129	
Leu	Lys	Thr	Gly	His	Arg	Asp	Glu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Val	Arg	Pro		

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

325	330	335	
ttg gtc gat aag ctg ggc ggg gcc ttg tcc aac tgg ttt gtt tcc ttg Leu Val Asp Lys Leu Gly Gly Ala Leu Ser Asn Trp Phe Val Ser Leu 340 345 350			1177
att gcc tta act gcc ggc atg acc act ggg gcg act gcc tca aca att Ile Ala Leu Thr Ala Gly Met Thr Thr Gly Ala Thr Ala Ser Thr Ile 355 360 365			1225
aca gct cat ggc cag atg gtc ttc aag tta gct atg ttt gcc tta ccg Thr Ala His Gly Gln Met Val Phe Lys Leu Ala Met Phe Ala Leu Pro 370 375 380			1273
gca gtc atg ctc ttg atc gct gtt tct att ttc gcc aaa aag gtc ttc Ala Val Met Leu Leu Ile Ala Val Ser Ile Phe Ala Lys Lys Val Phe 385 390 395 400			1321
ttg act gaa gaa aag cac gcg gaa atc gtc gac cag ctg gaa act caa Leu Thr Glu Glu Lys His Ala Glu Ile Val Asp Gln Leu Glu Thr Gln 405 410 415			1369
ttc agc caa agc cat gcc caa aag ccg gcg caa gct gaa agc ttc act Phe Ser Gln Ser His Ala Gln Lys Pro Ala Gln Ala Glu Ser Phe Thr 420 425 430			1417
ttg gcc agc cca gtc tcc gga caa tta atg aac ctg gac atg gtt gac Leu Ala Ser Pro Val Ser Gly Gln Leu Met Asn Leu Asp Met Val Asp 435 440 445			1465
gac ccg gtc ttt gcc gac aaa aag tta ggc gac ggc ttt gcc ctg gtg Asp Pro Val Phe Ala Asp Lys Lys Leu Gly Asp Gly Phe Ala Leu Val 450 455 460			1513
cca gca gac ggt aag gtc tac gcg cca ttt gcc ggt act gtc cgc cag Pro Ala Asp Gly Lys Val Tyr Ala Pro Phe Ala Gly Thr Val Arg Gln 465 470 475 480			1561
ctg gcc aag acc ccg cac tcg atc gtc ctg gaa aat gaa cat ggg gtc Leu Ala Lys Thr Arg His Ser Ile Val Leu Glu Asn Glu His Gly Val 485 490 495			1609
ttg gtc ttg att cac ctt ggc ctg ggc acg gtc aaa tta aac ggg act Leu Val Leu Ile His Leu Gly Leu Gly Thr Val Lys Leu Asn Gly Thr 500 505 510			1657
ggc ttt gtc agc tat gtt gaa gag ggc agc cag gta gaa gcc ggc cag Gly Phe Val Ser Tyr Val Glu Glu Gly Ser Gln Val Glu Ala Gly Gln 515 520 525			1705
cag atc ctg gaa ttc tgg gac ccg gcg atc aag cag gcc aag ctg gac Gln Ile Leu Glu Phe Trp Asp Pro Ala Ile Lys Gln Ala Lys Leu Asp 530 535 540			1753
gac acg gta atc gtg acc gtc atc aac agc gaa act ttc gca aat agc Asp Thr Val Ile Val Thr Val Ile Asn Ser Glu Thr Phe Ala Asn Ser 545 550 555 560			1801
cag atg ctc ttg ccg atc ggc cac agc gtc caa gcc ctg gat gat gta Gln Met Leu Leu Pro Ile Gly His Ser Val Gln Ala Leu Asp Asp Val 565 570 575			1849

**THIS PAGE BLANK (uspto)**

ttc aag tta gaa ggg aag aat tag aaa atg agc aat aag tta gta aaa	1897
Phe Lys Leu Glu Gly Lys Asn Met Ser Asn Lys Leu Val Lys	
580 585 590	
gaa aaa aga gtt gac cag gca gac ttg gcc tgg ctg act gac ccg gaa	1945
Glu Lys Arg Val Asp Gln Ala Asp Leu Ala Trp Leu Thr Asp Pro Glu	
595 600 605	
gtt tac gaa gtc aat aca att ccc ccg cac tcc gac cat gag tcc ttc	1993
Val Tyr Glu Val Asn Thr Ile Pro Pro His Ser Asp His Glu Ser Phe	
610 615 620	
caa agc cag gaa gaa ctg gag gag ggc aag tcc agt tta gtg cag tcc	2041
Gln Ser Gln Glu Glu Leu Glu Glu Gly Lys Ser Ser Leu Val Gln Ser	
625 630 635	
ctg gac ggg gac tgg ctg att gac tac gct gaa aac ggc cag gga cca	2089
Leu Asp Gly Asp Trp Leu Ile Asp Tyr Ala Glu Asn Gly Gln Gly Pro	
640 645 650 655	
gtc aac ttc tat gca gaa gac ttt gac gat agc aat ttt aag tca gtc	2137
Val Asn Phe Tyr Ala Glu Asp Phe Asp Asp Ser Asn Phe Lys Ser Val	
660 665 670	
aaa gta ccc ggc aac ctg gaa ctg caa ggc ttt ggc cag ccc cag tat	2185
Lys Val Pro Gly Asn Leu Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln Pro Gln Tyr	
675 680 685	
gtc aac gtc caa tat cca tgg gac ggc agt gag gag att ttc ccg ccc	2233
Val Asn Val Gln Tyr Pro Trp Asp Gly Ser Glu Glu Ile Phe Pro Pro	
690 695 700	
caa att cca agc aaa aat ccg ctc gct tct tat gtc aga tac ttt gac	2281
Gln Ile Pro Ser Lys Asn Pro Leu Ala Ser Tyr Val Arg Tyr Phe Asp	
705 710 715	
ctg gat gaa gct ttc tgg gac aag gaa gtc agc ttg aag ttt gac ggg	2329
Leu Asp Glu Ala Phe Trp Asp Lys Glu Val Ser Leu Lys Phe Asp Gly	
720 725 730 735	
gcg gca aca gcc atc tat gtc tgg ctg aac ggc cac ttc gtc ggc tac	2377
Ala Ala Thr Ala Ile Tyr Val Trp Leu Asn Gly His Phe Val Gly Tyr	
740 745 750	
ggg gaa gac tcc ttt acc cca agc gag ttt atg gtt acc aag ttc ctc	2425
Gly Glu Asp Ser Phe Thr Pro Ser Glu Phe Met Val Thr Lys Phe Leu	
755 760 765	
aag aaa gaa aat aac cgc ctg gca gtg gct ctc tac aag tat tct tcc	2473
Lys Lys Glu Asn Asn Arg Leu Ala Val Ala Leu Tyr Lys Tyr Ser Ser	
770 775 780	
gcc tcc tgg ctg gaa gac cag gac ttc tgg cgc atg tct ggt ttg ttc	2521
Ala Ser Trp Leu Glu Asp Gln Asp Phe Trp Arg Met Ser Gly Leu Phe	
785 790 795	
aga tca gtg act ctt cag gcc aag ccg cgt ctg cac ttg gag gac ctt	2569
Arg Ser Val Thr Leu Gln Ala Lys Pro Arg Leu His Leu Glu Asp Leu	
800 805 810 815	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



aag ctt acg gcc agc ttg acc gat aac tac caa aaa gga aag ctg gaa Lys Leu Thr Ala Ser Leu Thr Asp Asn Tyr Gln Lys Gly Lys Leu Glu 820 825 830	2617
gtc gaa gcc aat att gcc tac cgc ttg cca aat gcc agc ttt aag ctg Val Glu Ala Asn Ile Ala Tyr Arg Leu Pro Asn Ala Ser Phe Lys Leu 835 840 845	2665
gaa gtg cgg gat agt gaa ggt gac ttg gtt gct gaa aag ctg ggc cca Glu Val Arg Asp Ser Glu Gly Asp Leu Val Ala Glu Lys Leu Gly Pro 850 855 860	2713
atc aga agc gag cag ctg gaa ttc act ctg gct gat ttg cca gta gct Ile Arg Ser Glu Gln Leu Glu Phe Thr Leu Ala Asp Leu Pro Val Ala 865 870 875	2761
gcc tgg agc gcg gaa aag cct aac ctt tac cag gtc cgc ctg tat tta Ala Trp Ser Ala Glu Lys Pro Asn Leu Tyr Gln Val Arg Leu Tyr Leu 880 885 890 895	2809
tac cag gca ggc agc ctc tta gag gtt agc cgg cag gaa gtg ggt ttc Tyr Gln Ala Gly Ser Leu Leu Glu Val Ser Arg Gln Glu Val Gly Phe 900 905 910	2857
cgc aac ttt gaa cta aaa gac ggg att atg tac ctt aac ggc cag cgg Arg Asn Phe Glu Leu Lys Asp Gly Ile Met Tyr Leu Asn Gly Gln Arg 915 920 925	2905
atc gtc ttc aag ggg gcc aac cgg cac gaa ttt gac agt aag ttg ggc Ile Val Phe Lys Gly Ala Asn Arg His Glu Phe Asp Ser Lys Leu Gly 930 935 940	2953
cgg gct atc aca gaa gag gat atg atc tgg gat atc aag acc atg aag Arg Ala Ile Thr Glu Glu Asp Met Ile Trp Asp Ile Lys Thr Met Lys 945 950 955	3001
cga agc aac atc aat gct gtc cgc tgc tct cac tac ccg aac cag tcc Arg Ser Asn Ile Asn Ala Val Arg Cys Ser His Tyr Pro Asn Gln Ser 960 965 970 975	3049
ctc ttt tac cgg ctc tgt gac aag tac ggc ctt tac gtc att gat gaa Leu Phe Tyr Arg Leu Cys Asp Lys Tyr Gly Leu Tyr Val Ile Asp Glu 980 985 990	3097
gct aac ctg gaa agc cac ggc acc tgg gaa aaa gtg ggg ggg cac gaa Ala Asn Leu Glu Ser His Gly Thr Trp Glu Lys Val Gly Gly His Glu 995 1000 1005	3145
gat cct agc ttc aat gtt cca ggc gat gac cag cat tgg ctg gga gcc Asp Pro Ser Phe Asn Val Pro Gly Asp Asp Gln His Trp Leu Gly Ala 1010 1015 1020	3193
agc tta tcc cgg gtg aag aac atg atg gct cgg gac aag aac cat gct Ser Leu Ser Arg Val Lys Asn Met Met Ala Arg Asp Lys Asn His Ala 1025 1030 1035	3241
tca atc ctg atc tgg tct tta ggc aat gag tct tac gcc ggc act gtc Ser Ile Leu Ile Trp Ser Leu Gly Asn Glu Ser Tyr Ala Gly Thr Val 1040 1045 1050 1055	3289
ttt gcc caa atg gct gat tac gtc cgg aag gct gat ccg acc cgg gtt	3337

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Phe Ala Gln Met Ala Asp Tyr Val Arg Lys Ala Asp Pro Thr Arg Val  
 1060 1065 1070  
 cag cac tat gaa ggg gtg acc cac aac cgg aag ttt gac gac gcc acc 3385  
 Gln His Tyr Glu Gly Val Thr His Asn Arg Lys Phe Asp Asp Ala Thr  
 1075 1080 1085  
 cag att gaa agc cgg atg tat gct ccg gcc aag gta att gaa gaa tac 3433  
 Gln Ile Glu Ser Arg Met Tyr Ala Pro Ala Lys Val Ile Glu Glu Tyr  
 1090 1095 1100  
 ttg acc aat aaa cca gcc aag cca ttt atc tca gtt gaa tac gct cac 3481  
 Leu Thr Asn Lys Pro Ala Lys Pro Phe Ile Ser Val Glu Tyr Ala His  
 1105 1110 1115  
 gcc atg ggc aac tcc gtc ggt gac ctg gcc gcc tac acg gcc ctg gaa 3529  
 Ala Met Gly Asn Ser Val Gly Asp Leu Ala Ala Tyr Thr Ala Leu Glu  
 1120 1125 1130 1135  
 aaa tac ccc cac tac cag ggc ggc ttc atc tgg gac tgg att gac caa 3577  
 Lys Tyr Pro His Tyr Gln Gly Gly Phe Ile Trp Asp Trp Ile Asp Gln  
 1140 1145 1150  
 gga ctg gaa aaa gac ggg cac ctg ctt tat ggg ggc gac ttc gat gac 3625  
 Gly Leu Glu Lys Asp Gly His Leu Leu Tyr Gly Gly Asp Phe Asp Asp  
 1155 1160 1165  
 cgg cca acc gac tat gaa ttc tgc ggg aac ggc ctg gtc ttt gct gac 3673  
 Arg Pro Thr Asp Tyr Glu Phe Cys Gly Asn Gly Leu Val Phe Ala Asp  
 1170 1175 1180  
 cgg act gaa tcg ccg aaa ctg gct aat gtc aag gcc ctt tac gcc aac 3721  
 Arg Thr Glu Ser Pro Lys Leu Ala Asn Val Lys Ala Leu Tyr Ala Asn  
 1185 1190 1195  
 ctt aag tta gaa gta aaa gat ggg cag ctc ttc ctc aaa aac gac aat 3769  
 Leu Lys Leu Glu Val Lys Asp Gly Gln Leu Phe Leu Lys Asn Asp Asn  
 1200 1205 1210 1215  
 tta ttt acc aac agc tca tct tac tac ttc ttg act agt ctt ttg gtc 3817  
 Leu Phe Thr Asn Ser Ser Ser Tyr Tyr Phe Leu Thr Ser Leu Leu Val  
 1220 1225 1230  
 gat ggc aag ttg acc tac cag agc cgg cct ctg acc ttt ggc ctg gag 3865  
 Asp Gly Lys Leu Thr Tyr Gln Ser Arg Pro Leu Thr Phe Gly Leu Glu  
 1235 1240 1245  
 cct ggc gaa tcc ggg acc ttt gcc ctg cct tgg ccg gaa gtc gct gat 3913  
 Pro Gly Glu Ser Gly Thr Phe Ala Leu Pro Trp Pro Glu Val Ala Asp  
 1250 1255 1260  
 gaa aaa gga gag gtc gtc tac cgg gta acg gcc cac tta aaa gaa gac 3961  
 Glu Lys Gly Glu Val Val Tyr Arg Val Thr Ala His Leu Lys Glu Asp  
 1265 1270 1275  
 ttg cct tgg gcg gat gag ggc ttc act gtg gct gaa gca gaa gaa gta 4009  
 Leu Pro Trp Ala Asp Glu Gly Phe Thr Val Ala Glu Ala Glu Glu Val  
 1280 1285 1290 1295  
 gct caa aag ctg ccg gaa ttt aag ccg gaa ggg cgg cca gat tta gtt 4057  
 Ala Gln Lys Leu Pro Glu Phe Lys Pro Glu Gly Arg Pro Asp Leu Val

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

1300	1305	1310	
gat tcc gac tac aac cta ggc ctg aaa gga aat aac ttc caa att ctc Asp Ser Asp Tyr Asn Leu Gly Leu Lys Gly Asn Asn Phe Gln Ile Leu 1315 1320 1325			4105
ttc tcc aag gtc aag ggc tgg ccg gtt tcc ctc aag tat gcc ggt agg Phe Ser Lys Val Lys Gly Trp Pro Val Ser Leu Lys Tyr Ala Gly Arg 1330 1335 1340			4153
gaa tac ttg aag cgg ctg ccg gaa ttt acc ttc tgg cgg gcc ctg acg Glu Tyr Leu Lys Arg Leu Pro Glu Phe Thr Phe Trp Arg Ala Leu Thr 1345 1350 1355			4201
gac aac gac cgg gga gct ggt tac ggc tat gat ctg gcc cgg tgg gaa Asp Asn Asp Arg Gly Ala Gly Tyr Gly Tyr Asp Leu Ala Arg Trp Glu 1360 1365 1370 1375			4249
aat gcc ggc aag tat gcc cgc ttg aaa gac atc agc tgc gag gtc aag Asn Ala Gly Lys Tyr Ala Arg Leu Lys Asp Ile Ser Cys Glu Val Lys 1380 1385 1390			4297
gaa gac tcc gtt ttg gtc aag act gcc ttt acg ttg cct gtc gcc tta Glu Asp Ser Val Leu Val Lys Thr Ala Phe Thr Leu Pro Val Ala Leu 1395 1400 1405			4345
aag ggt gat tta act gtg acc tat gaa gtc gat gga cgg ggc aag att Lys Gly Asp Leu Thr Val Thr Tyr Glu Val Asp Gly Arg Gly Lys Ile 1410 1415 1420			4393
gct gta aca gct gac ttc cca ggc gcg gaa gaa gcc ggt ctc ttg cca Ala Val Thr Ala Asp Phe Pro Gly Ala Glu Glu Ala Gly Leu Leu Pro 1425 1430 1435			4441
gcc ttt ggc ttg aac ctg gcc ctg cca aaa gaa ctg acc gat tac cgc Ala Phe Gly Leu Asn Leu Ala Leu Pro Lys Glu Leu Thr Asp Tyr Arg 1440 1445 1450 1455			4489
tac tat ggt ctg gga cct aat gag agc taa ccagaccgct tggaaggtaa Tyr Tyr Gly Leu Gly Pro Asn Glu Ser 1460 1465			4539
ttacctgggc atctaccagg gagcggtaaa aaagaacttt agcccatacc tgcgtccgca			4599
ggaaacgggc aaccggagca aggttcgctg gtaccagctc tttgatgaaa agggcggctt			4659
ggaattttacg gccaatgggg cagacttgaa cttgtctgct ttgccatatt ctgccgccca			4719
aattgaagca gcggaccacg cttttgaact gactaacaat tacacttggg ttagagcctt			4779
aagcgcccgag atgggggtcg gcggggatga ctctggggg cagaagggtcc acccggaatt			4839
ctgcctggat gctcaaaaag cccgccagct ccgcctggtg attcagcccc ttttactaaa			4899
ataaatgcta caattgactt aacaggatga aatttttagta aaagcaaagc gaggtaggaa			4959
gatggcaacg atcagagaag tgccaaggca gccggcgtgt cgctagcgac ggtttccgcg			5019
gtcttgaact atgaccagac cctgtcagtc aatgaggcaa			5059

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<210> 2  
 <211> 583  
 <212> PRT  
 <213> Lactobacillus bulgaricus

<400> 2  
 Val Val Gly Gly Gly Ile Ile Ser Ser Leu Ala Leu Leu Ala Leu Phe  
   1                  5                  10                  15  
 Thr Asp Phe Gly Gly Ile Asn Gln Ser Asn Pro Val Val Tyr Leu Val  
           20                  25                  30  
 Ile Phe Gly Ile Val Tyr Leu Ile Met Asp Ile Phe Tyr Ser Phe Lys  
           35                  40                  45  
 Asp Thr Gly Phe Trp Ala Met Ile Pro Ala Leu Ser Leu Asp Ser Arg  
       50                  55                  60  
 Glu Arg Glu Lys Thr Ser Thr Phe Ala Arg Val Gly Ser Thr Ile Gly  
       65                  70                  75                  80  
 Ala Asn Leu Val Gly Val Val Ile Thr Pro Ile Ile Leu Phe Phe Ser  
           85                  90                  95  
 Ala Ser Lys Ala Asn Pro Asn Gly Asp Lys Gln Gly Trp Phe Phe Phe  
          100                 105                 110  
 Ala Leu Ile Val Ala Ile Val Gly Ile Leu Thr Ser Ile Thr Val Gly  
       115                 120                 125  
 Leu Gly Thr His Glu Val Lys Ser Ala Leu Arg Glu Ser Asn Glu Lys  
      130                 135                 140  
 Thr Thr Leu Lys Gln Val Phe Lys Val Leu Gly Gln Asn Asp Gln Leu  
  145                 150                 155                 160  
 Leu Trp Leu Ala Phe Ala Tyr Trp Phe Tyr Gly Leu Gly Ile Asn Thr  
          165                 170                 175  
 Leu Asn Ala Leu Gln Leu Tyr Tyr Phe Ser Tyr Ile Leu Gly Asp Ala  
          180                 185                 190  
 Arg Gly Tyr Ser Leu Leu Tyr Thr Ile Asn Thr Phe Val Gly Leu Ile  
      195                 200                 205  
 Ser Ala Ser Phe Phe Pro Ser Leu Ala Lys Lys Phe Asn Arg Asn Arg  
      210                 215                 220  
 Leu Phe Tyr Ala Cys Ile Ala Val Met Leu Leu Gly Ile Gly Val Phe  
  225                 230                 235                 240  
 Ser Val Ala Ser Gly Ser Leu Ala Leu Ser Leu Val Gly Ala Glu Phe  
          245                 250                 255  
 Phe Phe Ile Pro Gln Pro Leu Ala Phe Leu Val Val Leu Met Ile Ile  
      260                 265                 270  
 Ser Asp Ala Val Glu Tyr Gly Gln Leu Lys Thr Gly His Arg Asp Glu  
      275                 280                 285  
 Ala Leu Thr Leu Ser Val Arg Pro Leu Val Asp Lys Leu Gly Gly Ala

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



290                                      295                                      300  
 Leu Ser Asn Trp Phe Val Ser Leu Ile Ala Leu Thr Ala Gly Met Thr  
 305                                      310                                      315                                      320  
 Thr Gly Ala Thr Ala Ser Thr Ile Thr Ala His Gly Gln Met Val Phe  
    325                                      330                                      335  
 Lys Leu Ala Met Phe Ala Leu Pro Ala Val Met Leu Leu Ile Ala Val  
    340                                      345                                      350  
 Ser Ile Phe Ala Lys Lys Val Phe Leu Thr Glu Glu Lys His Ala Glu  
    355                                      360                                      365  
 Ile Val Asp Gln Leu Glu Thr Gln Phe Ser Gln Ser His Ala Gln Lys  
    370                                      375                                      380  
 Pro Ala Gln Ala Glu Ser Phe Thr Leu Ala Ser Pro Val Ser Gly Gln  
 385                                      390                                      395                                      400  
 Leu Met Asn Leu Asp Met Val Asp Asp Pro Val Phe Ala Asp Lys Lys  
    405                                      410                                      415  
 Leu Gly Asp Gly Phe Ala Leu Val Pro Ala Asp Gly Lys Val Tyr Ala  
    420                                      425                                      430  
 Pro Phe Ala Gly Thr Val Arg Gln Leu Ala Lys Thr Arg His Ser Ile  
    435                                      440                                      445  
 Val Leu Glu Asn Glu His Gly Val Leu Val Leu Ile His Leu Gly Leu  
    450                                      455                                      460  
 Gly Thr Val Lys Leu Asn Gly Thr Gly Phe Val Ser Tyr Val Glu Glu  
 465                                      470                                      475                                      480  
 Gly Ser Gln Val Glu Ala Gly Gln Gln Ile Leu Glu Phe Trp Asp Pro  
    485                                      490                                      495  
 Ala Ile Lys Gln Ala Lys Leu Asp Asp Thr Val Ile Val Thr Val Ile  
    500                                      505                                      510  
 Asn Ser Glu Thr Phe Ala Asn Ser Gln Met Leu Leu Pro Ile Gly His  
    515                                      520                                      525  
 Ser Val Gln Ala Leu Asp Asp Val Phe Lys Leu Glu Gly Lys Asn  
    530                                      535                                      540  
    Met Ser Asn Lys Leu Val Lys Glu Lys Arg Val Asp Gln Ala Asp  
    545                                      550                                      555  
 Leu Ala Trp Leu Thr Asp Pro Glu Val Tyr Glu Val Asn Thr Ile Pro  
 560                                      565                                      570                                      575  
 Pro His Ser Asp His Glu Ser Phe  
    580

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 841

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lactobacillus bulgaricus

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<400> 3  
 Ser Gln Glu Glu Leu Glu Glu Gly Lys Ser Ser Leu Val Gln Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Asp Gly Asp Trp Leu Ile Asp Tyr Ala Glu Asn Gly Gln Gly Pro Val  
 20 25 30  
 Asn Phe Tyr Ala Glu Asp Phe Asp Asp Ser Asn Phe Lys Ser Val Lys  
 35 40 45  
 Val Pro Gly Asn Leu Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln Pro Gln Tyr Val  
 50 55 60  
 Asn Val Gln Tyr Pro Trp Asp Gly Ser Glu Glu Ile Phe Pro Pro Gln  
 65 70 75 80  
 Ile Pro Ser Lys Asn Pro Leu Ala Ser Tyr Val Arg Tyr Phe Asp Leu  
 85 90 95  
 Asp Glu Ala Phe Trp Asp Lys Glu Val Ser Leu Lys Phe Asp Gly Ala  
 100 105 110  
 Ala Thr Ala Ile Tyr Val Trp Leu Asn Gly His Phe Val Gly Tyr Gly  
 115 120 125  
 Glu Asp Ser Phe Thr Pro Ser Glu Phe Met Val Thr Lys Phe Leu Lys  
 130 135 140  
 Lys Glu Asn Asn Arg Leu Ala Val Ala Leu Tyr Lys Tyr Ser Ser Ala  
 145 150 155 160  
 Ser Trp Leu Glu Asp Gln Asp Phe Trp Arg Met Ser Gly Leu Phe Arg  
 165 170 175  
 Ser Val Thr Leu Gln Ala Lys Pro Arg Leu His Leu Glu Asp Leu Lys  
 180 185 190  
 Leu Thr Ala Ser Leu Thr Asp Asn Tyr Gln Lys Gly Lys Leu Glu Val  
 195 200 205  
 Glu Ala Asn Ile Ala Tyr Arg Leu Pro Asn Ala Ser Phe Lys Leu Glu  
 210 215 220  
 Val Arg Asp Ser Glu Gly Asp Leu Val Ala Glu Lys Leu Gly Pro Ile  
 225 230 235 240  
 Arg Ser Glu Gln Leu Glu Phe Thr Leu Ala Asp Leu Pro Val Ala Ala  
 245 250 255  
 Trp Ser Ala Glu Lys Pro Asn Leu Tyr Gln Val Arg Leu Tyr Leu Tyr  
 260 265 270  
 Gln Ala Gly Ser Leu Leu Glu Val Ser Arg Gln Glu Val Gly Phe Arg  
 275 280 285  
 Asn Phe Glu Leu Lys Asp Gly Ile Met Tyr Leu Asn Gly Gln Arg Ile  
 290 295 300  
 Val Phe Lys Gly Ala Asn Arg His Glu Phe Asp Ser Lys Leu Gly Arg  
 305 310 315 320

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Ala Ile Thr Glu Glu Asp Met Ile Trp Asp Ile Lys Thr Met Lys Arg  
 325 330 335  
 Ser Asn Ile Asn Ala Val Arg Cys Ser His Tyr Pro Asn Gln Ser Leu  
 340 345 350  
 Phe Tyr Arg Leu Cys Asp Lys Tyr Gly Leu Tyr Val Ile Asp Glu Ala  
 355 360 365  
 Asn Leu Glu Ser His Gly Thr Trp Glu Lys Val Gly Gly His Glu Asp  
 370 375 380  
 Pro Ser Phe Asn Val Pro Gly Asp Asp Gln His Trp Leu Gly Ala Ser  
 385 390 395 400  
 Leu Ser Arg Val Lys Asn Met Met Ala Arg Asp Lys Asn His Ala Ser  
 405 410 415  
 Ile Leu Ile Trp Ser Leu Gly Asn Glu Ser Tyr Ala Gly Thr Val Phe  
 420 425 430  
 Ala Gln Met Ala Asp Tyr Val Arg Lys Ala Asp Pro Thr Arg Val Gln  
 435 440 445  
 His Tyr Glu Gly Val Thr His Asn Arg Lys Phe Asp Asp Ala Thr Gln  
 450 455 460  
 Ile Glu Ser Arg Met Tyr Ala Pro Ala Lys Val Ile Glu Glu Tyr Leu  
 465 470 475 480  
 Thr Asn Lys Pro Ala Lys Pro Phe Ile Ser Val Glu Tyr Ala His Ala  
 485 490 495  
 Met Gly Asn Ser Val Gly Asp Leu Ala Ala Tyr Thr Ala Leu Glu Lys  
 500 505 510  
 Tyr Pro His Tyr Gln Gly Gly Phe Ile Trp Asp Trp Ile Asp Gln Gly  
 515 520 525  
 Leu Glu Lys Asp Gly His Leu Leu Tyr Gly Gly Asp Phe Asp Asp Arg  
 530 535 540  
 Pro Thr Asp Tyr Glu Phe Cys Gly Asn Gly Leu Val Phe Ala Asp Arg  
 545 550 555 560  
 Thr Glu Ser Pro Lys Leu Ala Asn Val Lys Ala Leu Tyr Ala Asn Leu  
 565 570 575  
 Lys Leu Glu Val Lys Asp Gly Gln Leu Phe Leu Lys Asn Asp Asn Leu  
 580 585 590  
 Phe Thr Asn Ser Ser Ser Tyr Tyr Phe Leu Thr Ser Leu Leu Val Asp  
 595 600 605  
 Gly Lys Leu Thr Tyr Gln Ser Arg Pro Leu Thr Phe Gly Leu Glu Pro  
 610 615 620  
 Gly Glu Ser Gly Thr Phe Ala Leu Pro Trp Pro Glu Val Ala Asp Glu  
 625 630 635 640

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Lys Gly Glu Val Val Tyr Arg Val Thr Ala His Leu Lys Glu Asp Leu  
                                 645                                650                                655  
 Pro Trp Ala Asp Glu Gly Phe Thr Val Ala Glu Ala Glu Glu Val Ala  
                                 660                                665                                670  
 Gln Lys Leu Pro Glu Phe Lys Pro Glu Gly Arg Pro Asp Leu Val Asp  
                                 675                                680                                685  
 Ser Asp Tyr Asn Leu Gly Leu Lys Gly Asn Asn Phe Gln Ile Leu Phe  
                                 690                                695                                700  
 Ser Lys Val Lys Gly Trp Pro Val Ser Leu Lys Tyr Ala Gly Arg Glu  
                                 705                                710                                715                                720  
 Tyr Leu Lys Arg Leu Pro Glu Phe Thr Phe Trp Arg Ala Leu Thr Asp  
                                 725                                730                                735  
 Asn Asp Arg Gly Ala Gly Tyr Gly Tyr Asp Leu Ala Arg Trp Glu Asn  
                                 740                                745                                750  
 Ala Gly Lys Tyr Ala Arg Leu Lys Asp Ile Ser Cys Glu Val Lys Glu  
                                 755                                760                                765  
 Asp Ser Val Leu Val Lys Thr Ala Phe Thr Leu Pro Val Ala Leu Lys  
                                 770                                775                                780  
 Gly Asp Leu Thr Val Thr Tyr Glu Val Asp Gly Arg Gly Lys Ile Ala  
                                 785                                790                                795                                800  
 Val Thr Ala Asp Phe Pro Gly Ala Glu Glu Ala Gly Leu Leu Pro Ala  
                                 805                                810                                815  
 Phe Gly Leu Asn Leu Ala Leu Pro Lys Glu Leu Thr Asp Tyr Arg Tyr  
                                 820                                825                                830  
 Tyr Gly Leu Gly Pro Asn Glu Ser  
                                 835                                840

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12N 15/56, A23C 9/123, C12N 1/20, 9/38 // (C12N 1/20, C12R 1:225)</b>		<b>A3</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/61627</b> (43) Date de publication internationale: 2 décembre 1999 (02.12.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01165 (22) Date de dépôt international: 17 mai 1999 (17.05.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/06456 22 mai 1998 (22.05.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): COMPAGNIE GERVAIS DANONE [FR/FR]; 126-130, rue Jules Guesde, F-92302 Levallois Perret (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BENBADIS, Laurent [FR/FR]; 7, avenue de Provence, F-92160 Anthony (FR). BRIGNON, Pierre [FR/FR]; 7, rue des Brasseurs, F-67200 Strasbourg (FR). GENDRE, François [FR/FR]; 49, rue du Maréchal Foch, F-67200 Strasbourg (FR). (74) Mandataires: ORES, Béatrice etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i> (88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 3 février 2000 (03.02.00)	
(54) Title: MUTANT <i>LACTOBACILLUS BULGARICUS</i> STRAINS FREE FROM BETA-GALACTOSIDE ACTIVITY (54) Titre: SOUCHES MUTANTES DE <i>LACTOBACILLUS BULGARICUS</i> DEPOURVUES D'ACTIVITE BETA-GALACTOSIDASE (57) Abstract <p>The invention concerns mutant <i>L. bulgaricus</i> strains bearing a nonsense mutation, in at least one of the sequences coding for the lactose operon, and free from <math>\beta</math>-galactosidase activity, and lactic starters comprising said strains. Said strains and starters can be used to obtain fermented milk products from glucose-added milk.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne des souches mutantes de <i>L. bulgaricus</i> portant une mutation non-sens, dans au moins l'une des séquences codantes de l'opéron lactose, et dépourvues d'activité <math>\beta</math>-galactosidase, et des ferments lactiques comprenant lesdites souches. Ces souches et ferments peuvent être utilisés pour l'obtention de produits laitiers fermentés à partir de lait additionné de glucose.</p>			

### **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroon			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01165

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 6 C12N15/56 A23C9/123 C12N1/20 C12N9/38 //(C12N1/20,  
 C12R1:225)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 6 C12N A23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 518 096 A (NESTLE SA) 16 December 1992 (1992-12-16) cited in the application the whole document	1-10
A	WO 90 05459 A (GENENCOR INC) 31 May 1990 (1990-05-31) cited in the application abstract	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 November 1999

Date of mailing of the international search report

08/12/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01165

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0518096 A	16-12-1992	AT 128325 T	15-10-1995
		AU 659154 B	11-05-1995
		AU 1715792 A	17-12-1992
		CA 2070591 A,C	15-12-1992
		CN 1068017 A	20-01-1993
		DE 69205070 D	02-11-1995
		DE 69205070 T	29-02-1996
		DK 518096 T	29-01-1996
		EG 20268 A	31-05-1998
		ES 2078585 T	16-12-1995
		FI 922680 A	15-12-1992
		GR 3018081 T	29-02-1996
		HK 1006505 A	05-03-1999
		IE 76149 B	08-10-1997
		JP 2620022 B	11-06-1997
		JP 5316948 A	03-12-1993
		MX 9202814 A	01-12-1992
		NO 922289 A	15-12-1992
		US 5382438 A	17-01-1995
WO 9005459 A	31-05-1990	AT 105143 T	15-05-1994
		AU 622968 B	30-04-1992
		AU 4743490 A	12-06-1990
		CA 2002796 A	21-05-1990
		CN 1054350 A	11-09-1991
		DE 68915160 D	09-06-1994
		DE 68915160 T	27-10-1994
		EP 0402450 A	19-12-1990
		ES 2055899 T	01-09-1994
		GR 89100766 A,B	31-12-1990
		HU 214779 B	28-05-1998
		MX 171939 B	24-11-1993
		NZ 231454 A	25-09-1992
		US 5639648 A	17-06-1997

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No

PCT/FR 99/01165

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 C12N15/56 A23C9/123 C12N1/20 C12N9/38 //(C12N1/20, C12R1:225)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12N A23C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 518 096 A (NESTLE SA) 16 décembre 1992 (1992-12-16) cité dans la demande le document en entier	1-10
A	WO 90 05459 A (GENENCOR INC) 31 mai 1990 (1990-05-31) cité dans la demande abrégé	1-10

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 novembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08/12/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lejeune, R

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem: Internationale No

PCT/FR 99/01165

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0518096 A	16-12-1992	AT 128325 T	15-10-1995
		AU 659154 B	11-05-1995
		AU 1715792 A	17-12-1992
		CA 2070591 A,C	15-12-1992
		CN 1068017 A	20-01-1993
		DE 69205070 D	02-11-1995
		DE 69205070 T	29-02-1996
		DK 518096 T	29-01-1996
		EG 20268 A	31-05-1998
		ES 2078585 T	16-12-1995
		FI 922680 A	15-12-1992
		GR 3018081 T	29-02-1996
		HK 1006505 A	05-03-1999
		IE 76149 B	08-10-1997
		JP 2620022 B	11-06-1997
		JP 5316948 A	03-12-1993
		MX 9202814 A	01-12-1992
		NO 922289 A	15-12-1992
		US 5382438 A	17-01-1995
WO 9005459 A	31-05-1990	AT 105143 T	15-05-1994
		AU 622968 B	30-04-1992
		AU 4743490 A	12-06-1990
		CA 2002796 A	21-05-1990
		CN 1054350 A	11-09-1991
		DE 68915160 D	09-06-1994
		DE 68915160 T	27-10-1994
		EP 0402450 A	19-12-1990
		ES 2055899 T	01-09-1994
		GR 89100766 A,B	31-12-1990
		HU 214779 B	28-05-1998
		MX 171939 B	24-11-1993
		NZ 231454 A	25-09-1992
		US 5639648 A	17-06-1997

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

09 AUG 2000

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire MJPcb191/143	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/01165	Date du dépôt international (jour/mois/année) 17/05/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 22/05/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/56		
Déposant COMPAGNIE GERVAIS DANONE et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 13/12/1999	Date d'achèvement du présent rapport 04.08.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Surdej, P N° de téléphone +49 89 2399 7334 

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01165

**I. Base du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

**Description, pages:**

1-14                      version initiale

**Revendications, N°:**

1-10                      version initiale

**Dessins, feuilles:**

1/1                      version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

☐ de la description,      pages :

☐ des revendications,    n°s :

☐ des dessins,              feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**voir feuille séparée**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01165

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 1-10
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-10
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-10
	Non : Revendications

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

**VII. Irrégularités dans la demande internationale**

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :

**voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

**voir feuille séparée**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Il est fait référence aux documents suivants:

**D1:** EP-A-0 518 096 (NESTLE SA) 16 décembre 1992 (1992-12-16) cité dans la demande

**D2:** WO 90 05459 A (GENENCOR INC) 31 mai 1990 (1990-05-31) cité dans la demande

**Concernant le point I**

Base de l'opinion

Les pages 1-12 du listage des séquences 1-3 sont prises en compte pour l'établissement de cette opinion.

**Concernant le point V**

Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

**Nouveauté et activité inventive (Art. 33.1 - 3)**

1. Les **revendications 1-5** sont nouvelles mais pas inventives à la lumière des documents **D1** et **D2**. L'application présente une solution alternative pour éviter la post-acidification du produit laitier après la fermentation au cours de la conservation. Elle consiste à utiliser un mutant bêta-galactosidase négatif de *L. Bulgaricus* et de choisir la vitesse et le niveau d'acidification en modulant l'ajout de glucose. L'opéron lactose de ce mutant porte une mutation non-sens dans le gène de la bêta-galactosidase.  
D1 présente une solution similaire avec toutes les caractéristiques techniques de l'application pour obtenir tous les effets techniques présentés dans l'application, la seule différence étant l'inactivation du gène de la bêta-galactosidase par une délétion partielle (page 2, lignes 5-6, 41-43, 48; page 3, lignes 22-24; page 5 exemple 1; exemple 3-6, page 7) .  
A la lumière de D2, il est montré que l'activité bêta-galactosidase peut être supprimée en introduisant une mutation ponctuelle (page 14, paragraphe 2 et table page 20) dans le gène de la bêta-galactosidase (les mutants conditionnels

**THIS PAGE BLANK (uspto)**

portant généralement une mutation ponctuelle).

Il est donc évident que la suppression de l'activité bêta-galactosidase de *L. Bulgaricus* peut être obtenue par une mutation ponctuelle au lieu d'une délétion partielle du gène de la bêta-galactosidase.

Les revendications 1-5 ne présentent donc pas d'activité inventive.

2. Les **revendications 6-10** sont nouvelles mais ne présentent pas d'activité inventive parce que des produits laitiers similaires à ceux décrits dans la présente application sont divulgués dans D1 et un procédé de préparation d'un produit laitier en fermentant du lait avec une souche de *L. Bulgaricus* en présence de glucose est présenté dans D1 avec un arrêt de la fermentation sans refroidissement du dit produit laitier (Exemples 3- 6 page 6). La combinaison des documents D1 et D2 rend évident l'objet des revendications 6-10.

#### **Concernant le point VII**

Irrégularités dans la demande internationale

3. Si les termes, comme par exemple "Anaéroculta" (page 9, ligne 23), font référence à des marques déposées, le fait qu'elles ne soient pas reconnues comme telles rend la description obscure (Art. 5 et directives concernant l'examen international II 4. 16 PCT).
4. Les termes "öse" et "NUNC" ne sont pas clairs et rendent la description obscure (Art. 5 PCT).

#### **Concernant le point VIII**

Observations relatives à la demande internationale

5. Dans la revendication 1, une caractéristique essentielle semble manquer (mutation dans le gène de la perméase). La revendication 1 ne remplit donc pas la condition visée à l'article 6 PCT en combinaison avec la règle 6.3 b) PCT, selon laquelle une revendication indépendante doit contenir toutes les caractéristiques techniques essentielles à la définition de l'invention. En effet, l'opéron lactose du mutant décrit dans l'application porte une substitution dans le gène de la perméase et une mutation non-sens dans le gène de la bêta-galactosidase. Le

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



déposant mentionne, à juste titre, que le taux de réversion des mutations ponctuelles (comme la mutation non-sens décrite dans la revendication 1) est très élevé. Ce qui rend beaucoup plus difficile la sélection et le maintien d'une souche ayant une mutation ponctuelle. Or la souche I-1968 reste stable en présence de glucose comme le montre le tableau 1 de la description. De plus, il ne ressort pas clairement de la description que la mutation non-sens est la seule modification essentielle et que la substitution n'est qu'accessoire pour obtenir tous les effets techniques de l'invention.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>MJPcb191/143</b>	<b>POUR SUITE</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après <b>A DONNER</b>	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 99/ 01165</b>	Date du dépôt international (jour/mois/année) <b>17/05/1999</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>22/05/1998</b>
Déposant  <b>COMPAGNIE GERVAIS DANONE et al.</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau International.

Ce rapport de recherche internationale comprend 2 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

#### 1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la langue, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☒ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remise ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remise ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☒ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☒ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

#### 4. En ce qui concerne le titre,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

#### 5. En ce qui concerne l'abrégé,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

#### 6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☐ Aucune des figures n'est à publier.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01165

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/56 A23C9/123 C12N1/20 C12N9/38 //(C12N1/20, C12R1:225)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 518 096 A (NESTLE SA) 16 December 1992 (1992-12-16) cited in the application the whole document	1-10
A	WO 90 05459 A (GENENCOR INC) 31 May 1990 (1990-05-31) cited in the application abstract	1-10

☐

Further documents are listed in the continuation of box C.

☒

Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 November 1999

Date of mailing of the international search report

08/12/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R

**THIS PAGE BLANK (uspto)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Interr 1st Application No

PCT/FR 99/01165

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0518096 A	16-12-1992	AT 128325 T	15-10-1995
		AU 659154 B	11-05-1995
		AU 1715792 A	17-12-1992
		CA 2070591 A,C	15-12-1992
		CN 1068017 A	20-01-1993
		DE 69205070 D	02-11-1995
		DE 69205070 T	29-02-1996
		DK 518096 T	29-01-1996
		EG 20268 A	31-05-1998
		ES 2078585 T	16-12-1995
		FI 922680 A	15-12-1992
		GR 3018081 T	29-02-1996
		HK 1006505 A	05-03-1999
		IE 76149 B	08-10-1997
		JP 2620022 B	11-06-1997
		JP 5316948 A	03-12-1993
		MX 9202814 A	01-12-1992
		NO 922289 A	15-12-1992
		US 5382438 A	17-01-1995
WO 9005459 A	31-05-1990	AT 105143 T	15-05-1994
		AU 622968 B	30-04-1992
		AU 4743490 A	12-06-1990
		CA 2002796 A	21-05-1990
		CN 1054350 A	11-09-1991
		DE 68915160 D	09-06-1994
		DE 68915160 T	27-10-1994
		EP 0402450 A	19-12-1990
		ES 2055899 T	01-09-1994
		GR 89100766 A,B	31-12-1990
		HU 214779 B	28-05-1998
		MX 171939 B	24-11-1993
		NZ 231454 A	25-09-1992
		US 5639648 A	17-06-1997

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No  
PCT/FR 99/01165

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/56 A23C9/123 C12N1/20 C12N9/38 //(C12N1/20,  
C12R1:225)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A23C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 518 096 A (NESTLE SA) 16 décembre 1992 (1992-12-16) cité dans la demande le document en entier	1-10
A	WO 90 05459 A (GENENCOR INC) 31 mai 1990 (1990-05-31) cité dans la demande abrégé	1-10

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 novembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08/12/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lejeune, R

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem: Internationale No

PCT/FR 99/01165

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0518096 A	16-12-1992	AT 128325 T	15-10-1995
		AU 659154 B	11-05-1995
		AU 1715792 A	17-12-1992
		CA 2070591 A,C	15-12-1992
		CN 1068017 A	20-01-1993
		DE 69205070 D	02-11-1995
		DE 69205070 T	29-02-1996
		DK 518096 T	29-01-1996
		EG 20268 A	31-05-1998
		ES 2078585 T	16-12-1995
		FI 922680 A	15-12-1992
		GR 3018081 T	29-02-1996
		HK 1006505 A	05-03-1999
		IE 76149 B	08-10-1997
		JP 2620022 B	11-06-1997
		JP 5316948 A	03-12-1993
		MX 9202814 A	01-12-1992
		NO 922289 A	15-12-1992
		US 5382438 A	17-01-1995
WO 9005459 A	31-05-1990	AT 105143 T	15-05-1994
		AU 622968 B	30-04-1992
		AU 4743490 A	12-06-1990
		CA 2002796 A	21-05-1990
		CN 1054350 A	11-09-1991
		DE 68915160 D	09-06-1994
		DE 68915160 T	27-10-1994
		EP 0402450 A	19-12-1990
		ES 2055899 T	01-09-1994
		GR 89100766 A,B	31-12-1990
		HU 214779 B	28-05-1998
		MX 171939 B	24-11-1993
		NZ 231454 A	25-09-1992
		US 5639648 A	17-06-1997

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**